

09/787504
PCT/JP 99/04549

日 本 国 特 許 庁

24.08.99

JP99/4549

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 08 OCT 1999	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 9月17日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第262941号

出 願 人
Applicant (s):

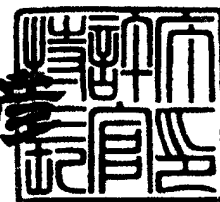
株式会社ヘリックス研究所

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-306410

【書類名】 特許願

【整理番号】 H1-004

【提出日】 平成10年 9月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 固定化cDNAライブラリー

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市請西2-16-13-401

【氏名】 太田 紀夫

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国カリフォルニア州アーバイン・ブルック
マウント8

【氏名】 三橋 将人

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町大室511-12

【氏名】 磯貝 隆夫

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市清見台南2-4-16-103

【氏名】 若松 愛

【特許出願人】

【識別番号】 597059742

【氏名又は名称】 株式会社ヘリックス研究所

【代表者】 永山 治

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

特平10-262941

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716404

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固定化 cDNA ライブラリー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 センス鎖 cDNA の 5' 側が固定されている cDNA ライブラリー。

【請求項 2】 センス鎖 cDNA の 5' 末端に、そのライブラリーを構成する cDNA に共通の塩基配列が存在する請求項 1 の cDNA ライブラリー

【請求項 3】 前記共通の塩基配列が、RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターのセンス配列である請求項 2 の cDNA ライブラリー。

【請求項 4】 前記共通の塩基配列が、任意のアミノ酸配列をコードするものであり、この塩基配列と cDNA とが同じ読み取り枠を構成する請求項 2 の cDNA ライブラリー。

【請求項 5】 センス鎖 cDNA が翻訳開始コドンを含む請求項 1 の cDNA ライブラリー。

【請求項 6】 翻訳開始コドンが mRNA に由来するものである請求項 5 の cDNA ライブラリー。

【請求項 7】 以下の工程を含む cDNA の合成方法であって、第 1 鎖 cDNA が 3' 末端に人為的に付加した既知の塩基配列を備え、第 2 鎖合成用プライマーとするオリゴヌクレオチドがその 5' 側において固相に結合したものである cDNA の合成方法。

a) 第 1 鎖 cDNA 合成用プライマーにより mRNA を鋳型として cDNA の第 1 鎖を合成する工程、

b) 工程 a) によって生成する第 1 鎖 cDNA の 3' 側に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを第 2 鎖合成用プライマーとしてセンス鎖 cDNA を合成する工程、

【請求項 8】 第 1 鎖 cDNA の 3' 末端に付加する配列が、以下の工程によって付加されたものである請求項 7 の cDNA の合成方法。

a) mRNA の 5' 末端に既知の配列を持つオリゴヌクレオチドを結合する工程、

b) 工程 a) の mRNA を鋳型とし第 1 鎖合成用プライマーによって第 1 鎖 cDNA を合成する工程、

【請求項 9】 前記工程 a) において、mRNA の 5' 末端に存在する CAP 構造を特異的に認識する方法によって前記オリゴヌクレオチドを結合する請求項 8 の cDNA の

合成方法。

【請求項 10】請求項 7-9 のいずれかの方法によって得ることができるセンス鎖 5' 固定化 cDNA。

【請求項 11】mRNA を材料として請求項 7-9 のいずれかに記載の cDNA の合成方法を実施することによって cDNA ライブラリーを合成する方法。

【請求項 12】請求項 11 の方法によって得ることができるセンス鎖 5' 固定化 cDNA ライブラリー。

【請求項 13】mRNA を材料として請求項 9 に記載の cDNA の合成方法を実施することによって得ることができる完全長 cDNA を含む cDNA ライブラリー。

【請求項 14】請求項 12 または 13 の cDNA ライブラリーを増幅することによって得ることができる、2 次的 cDNA ライブラリー。

【請求項 15】請求項 3 の cDNA ライブラリーを鋳型として、前記 RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列を認識する DNA 依存型 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成し、mRNA ライブラリーを得る方法。

【請求項 16】請求項 15 の方法により得ることができる、mRNA ライブラリー。

【請求項 17】請求項 16 の mRNA ライブラリーを発現システムに適用することによってタンパク質に翻訳する工程を含むタンパク質ライブラリーの調製方法。

【請求項 18】請求項 17 の方法によって得ることができるタンパク質ライブラリー。

【請求項 19】下記の工程 a) - c) を含む cDNA のサブトラクション法

- a) テスターとする cDNA ライブラリーを合成する工程
- b) 請求項 1、12、および 13 のいずれかに記載のセンス鎖 cDNA ライブラリーをドライバーとし、テスター cDNA をハイブリダイズさせる工程、および
- c) 工程 b) においてハイブリダイズしなかった cDNA またはハイブリダイズした cDNA を選択する工程

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、cDNA ライブラリーならびにその合成方

法、これを鋳型とするRNAあるいはRNAライブラリー、更にはタンパク質ライブラリーの調製法に関する。

【0002】

【従来の技術】

分子遺伝学的なアプローチの手法の一つに、mRNAを鋳型として逆転写したcDNAを材料に用いる方法が古くから行われている。cDNAを用いることにより、実際に細胞の中で発現している遺伝子の状態を把握することができることから、遺伝情報そのものであるゲノムを材料とするアプローチと並んで重要な研究手法であると言える。

【0003】

cDNAを研究材料とする場合には、一般にmRNAをもとに合成したcDNAライブラリーを作成する。cDNAライブラリーには、mRNAの状態をできるだけ正確に反映していること、その後のクローニングやスクリーニングを進めやすいこと、といった条件を満たすことが求められる。mRNAの状態の反映とは、もとの細胞におけるmRNAのポピュレーションを維持していることを意味する。たとえば発現の弱い遺伝子が、cDNAの合成やライブラリーの複製にあたって失われてしまうことがあっては、効率的な研究を進めることはできない。更に、鋳型となるRNAの抽出やcDNAの合成に当たって、mRNAの全長をきちんと写し取っているかどうかライブラリーの質を左右する重要な要素となる。遺伝子が途中で切断されてしまうと、特に遺伝子から転写されたタンパク質を指標にスクリーニングを進める場合に大きな障害となる可能性がある。一方、クローニングやスクリーニングの操作性とは、たとえばクローニング用ベクターへの組み込みが容易であるとか、ある程度の量のタンパク質として迅速に発現させることが可能といった特徴を持つことが挙げられる。

【0004】

いくつかの代表的なcDNAライブラリーの合成方法が普及している。mRNAの3'側に共通して存在するポリ(A)というA(アデニン)が連続した部分を利用して、逆転写酵素により第1鎖cDNAを合成するのが一般的である。第1鎖合成後のクローニング方法については、いろいろな工夫が行われている。通常は第1鎖を鋳型と

して第2鎖を合成して2本鎖とする一方、何らかの手段によってcDNAの末端に制限酵素サイトを付加し、適当なベクターに組み込んでベクターライブラリーを得る方法がとられる。すなわち、オリゴdTプライマーによって増幅した第1鎖をGubler-Hoffman法やランダムプライマーにより2本鎖とし、その5'末端を平滑化してアダプターをライゲーションする。これを制限酵素処理してベクターのクローニングサイトに挿入し、ベクターライブラリーとする。ベクターには、 λ gt11等のファージベクターやblue script (商品名) 等のプラスミドベクターが利用される。

以上のような方法では、mRNAの5'側が必ずしも完全にcDNAとして合成できるとは限らないという問題があった。たとえばランダムプライマーを使って2本鎖とした場合には、もとのmRNAの3'ポリ(A)側に偏った短い配列が生成されやすくなる。Gubler-Hoffman法は、第1鎖cDNAとハイブリダイズしている鋳型となったmRNAにRNaseHでニックをいれ、これを複製起点として第2鎖cDNAを合成する方法で、比較的鎖長の長いcDNAを得やすいとされている。

【0005】

更に完全長cDNAを含んだベクターライブラリーをより効率的に得る方法として、5'末端にターミナルトランスフェラーゼを使ってC連鎖を付加し、直接ベクターに組み込めるようにしたOkayama-Berg法(Okayama, H. Berg, P.: High-efficiency cloning of full-length cDNAs. Mol. Cell Biol., 2:161-170, 1982)も公知である。この他、mRNAの5'側に合成したオリゴヌクレオチドを特異的に導入し、この部分に相補的なプライマーを使って2本鎖cDNAを合成することによって完全長cDNAを得ようという試みも報告されている(Maruyama, S. and Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the CAP structure of eucaryotic mRNAs with oligonucleotides. Gene 138 (1994): 171-174, Merenkova, N. et al. Method for the specific coupling of the CAP of the extremity 5' of a fragment mRNA and preparation of complete cDNA. PCT/FR96/00651, 1996)。これらの方法によれば、mRNAの5'側末端に存在するCAP構造が特異的に人為的なオリゴヌクレオチドに置換される。そしてこのオリゴヌクレオチドに相補的な配列を第2鎖cDNA合成の複製起点とすることにより、原理的にはmRNAの5'末端領域の

配列を含むcDNAが得られることになる。しかしこのような方法によって得られる1次ライブラリーに含まれる完全長cDNAの数は少なく、cDNAライブラリーとしての多様性を維持したまま、それをマスターライブラリーとして完全長cDNAライブラリーを増幅することは困難であった。

【0006】

以上の方法によれば、mRNAからcDNAベクターライブラリーを得ることになる。この他に、cDNAを固定化することも行われている。固定化cDNAライブラリー法では、オリゴdTプライマーを固相に固定化した状態で利用する、固定化オリゴdTプライマー法(Mitsuhashi, M. Gene manipulation on plastic plates. Nature 357(1992):519-520)が公知である。試料中のmRNAを固定化オリゴdTプライマーで捕捉できることから、他の方法では必須となっているRNAの抽出操作が不要となる。捕捉されたmRNAを鋳型として、逆転写酵素により第1鎖が合成される。オリゴdTプライマーは固定されているので、このとき合成される第1鎖もまた固定化されている。すなわち、ここで得られるcDNAライブラリーは、アンチセンス鎖5'固定化cDNAライブラリーとなる。得られた第1鎖をプライマリーライブラリーとすれば、PCRによって合成した二次的なcDNAライブラリーとの分離が容易であり、しかも第1鎖は再利用が可能である。Solid Phase cDNA Synthesis Kit (寶酒造製、商品名)は、固定化cDNAライブラリー法に必要な試薬類をパッケージにしたキットである。

【0007】

しかしアンチセンス鎖(第1鎖)の5'端を固定化したcDNAライブラリーにおいては、不完全長cDNAが多く含まれるという問題点がある。固定化オリゴdTプライマーによって固相上に合成される第1鎖cDNAは、理論的にはポリ(A)を有するmRNAの全てを逆転写したものとなる。しかしオリゴdTで選択される現実のmRNAは、その5'側において不完全な長さを持つものも多く含んでいる。通常の条件では、完全長mRNAがmRNA全体に占める割合は低い。完全長mRNAの割合は、mRNAが由来する試料の種類や状態、あるいは抽出条件によっても変動するが、いずれにせよ不完全な長さのものが大部分を占める。したがって、固定化オリゴdTプライマーによって固定化されたcDNAライブラリーを構成するcDNAの大部分は、不完全な配列

を写し取ったものになってしまう。そのうえ、たとえ mRNA が完全長であったとしても cDNA の合成がその 5' 末端まで完全に行われるとは限らないため、ますます完全長 cDNA の割合は小さくなる。

【0008】

それでも mRNA の全てを捕捉できれば、mRNA のポピュレーションの反映という条件を満たすことはできる。更に前述の完全長 cDNA を得るための方法と組み合わせれば、完全長 cDNA に富む固定化ライブラリーの提供も期待できるかもしれない。ところが現実には、第 1 鎖 cDNA の 5' 側 (mRNA の 3' 側に相当する) を固定化する方法では完全長 cDNA を選択的に固定化することができないので、固定化 cDNA ライブラリーにおける完全長 cDNA の構成比率を高めることにはつながらないのである。

【0009】

更に公知の固定化オリゴdT法においては、固定化した第 1 鎖 cDNA をマスターライブラリーとして 2 次的な cDNA ライブラリーを得ることが難しいという問題点を有していた。たとえばランダムプライマーによって第 2 鎖を合成した場合には、短い断片にポピュレーションが偏ったライブラリーとなりやすい。あるいはオリゴCAP法との組み合わせによって完全長 cDNA をある程度含む状態にあるとしても、固定化される cDNA に占める完全長 cDNA の割合が低いため、2 次的なライブラリーに高い品質 (すなわち完全長 cDNA の多様性) の維持は期待できない。

【0010】

ところで、センス鎖 cDNA の上流に、T7 プロモーター、T3 プロモーター、SP6 プロモーター配列など、インビトロでの RNA 合成を可能にするプロモーター配列を配置することにより、cDNA を鋳型としてインビトロで RNA を合成する技術が公知である。これを固定化 cDNA ライブラリーに応用すれば、RNA ポリメラーゼを利用してインビトロで mRNA のライブラリーを合成することができることになる。しかし第 1 鎖 cDNA の 5' 側を固定化した場合には、先に述べたとおり mRNA の 5' 側に相当する部分 (翻訳開始点を含む側) を含んだ cDNA の割合が低いため、高い効率でのタンパク質への翻訳は期待できない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、新規な構造を備えた固定化cDNAライブラリーを提供することである。すなわち本発明の課題は、センス鎖cDNAの5'末端側を固相上に固定化したcDNAを提供することにある。あるいはその技術を利用して、cDNAライブラリーを提供することも本発明の課題である。

【0012】

加えて本発明の望ましい態様においては、完全長cDNAの割合が高く、またそのcDNAのポピュレーションを2次的なライブラリーにおいてより忠実に反映させることが可能なプライマリーライブラリーとして有用な、良質なセンス鎖5'固定化cDNAライブラリーの提供を課題としている。更に本発明の別の態様においては、センス鎖cDNA上流へのRNAポリメラーゼプロモーター等任意の遺伝子配列を付加することができるセンス鎖cDNAライブラリーの提供を課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、第1鎖cDNA（アンチセンス鎖）の3'末端に人為的な塩基配列を付加し、この塩基配列を利用することによって前記課題を達成できるのではないかと考えた。つまり、あらかじめこの人為的な塩基配列に相補的な配列を3'末端側に含む合成オリゴヌクレオチドの5'末端側を固相に固定化しておき、この合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズにより、第1鎖cDNAを捕捉することができる。この状態で固定化合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、捕捉された第1鎖（アンチセンス鎖）cDNAを鋳型に第1鎖の3'→5'の向きに第2鎖（すなわちセンス鎖）cDNA合成反応を行えば、任意のcDNAをセンス鎖の5'末端側を固定化した形で固相上に合成することが可能となる（図1）。

【0014】

更に本発明者らは、センス鎖（すなわち第2鎖）の5'側の固定化を実現することによって様々な効果が期待できることを見出した。すなわち、たとえば本発明によるcDNAの合成方法をcDNAライブラリーの合成に応用することによって、原理的には完全長cDNAのみで構成される理想的なcDNAライブラリーの提供が可能となることを見出し本発明を完成した。あるいはまた、センス鎖5'側の人為的な塩基配列の付加を実現したことによって、固定化cDNAライブラリーにおけるセンス

鎖の上流への任意の塩基配列の配置を可能とし、新規なcDNAライブラリーの用途を見出した。すなわち本発明は、以下のcDNAライブラリー、ならびにその製造方法と用途に関する。

【0015】

(1) センス鎖cDNAの5'側が固定されているcDNAライブラリー。

(2) センス鎖cDNAの5'末端に、そのライブラリーを構成するcDNAに共通の塩基配列が存在する(1)のcDNAライブラリー

(3) 前記共通の塩基配列が、RNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターのセンス配列である(2)のcDNAライブラリー。

(4) 前記共通の塩基配列が、任意のアミノ酸配列をコードするものであり、この塩基配列とcDNAとが同じ読み取り枠を構成する(2)のcDNAライブラリー。

(5) センス鎖cDNAが翻訳開始コドンを含む(1)のcDNAライブラリー。

(6) 翻訳開始コドンがmRNAに由来するものである(5)のcDNAライブラリー。

【0016】

(7) 以下の工程を含むcDNAの合成方法であって、第1鎖cDNAが3'末端に人為的に付加した既知の塩基配列を備え、第2鎖合成用プライマーとするオリゴヌクレオチドがその5'側において固相に結合したものであるcDNAの合成方法。

a) 第1鎖cDNA合成用プライマーによりmRNAを鋳型としてcDNAの第1鎖を合成する工程、

b) 工程a)によって生成する第1鎖cDNAの3'側に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを第2鎖合成用プライマーとしてセンス鎖cDNAを合成する工程、

(8) 第1鎖cDNAの3'末端に付加する配列が、以下の工程によって付加されたものである(7)のcDNAの合成方法。

a) mRNAの5'末端に既知の配列を持つオリゴヌクレオチドを結合する工程、

b) 工程a)のmRNAを鋳型とし第1鎖合成用プライマーによって第1鎖cDNAを合成する工程、

(9) 前記工程a)において、mRNAの5'末端に存在するCAP構造を特異的に認識する方法によって前記オリゴヌクレオチドを結合する(8)のcDNAの合成方法。

【0017】

(10) (7) - (9) のいずれかの方法によって得ることができるセンス鎖5' 固定化cDNA。

(11) mRNAを材料として(7) - (9) のいずれかに記載のcDNAの合成方法を実施することによってcDNAライブラリーを合成する方法。

(12) (11) の方法によって得ることができるセンス鎖5' 固定化cDNAライブラリー。

(13) mRNAを材料として(9) に記載のcDNAの合成方法を実施することによって得ることができる完全長cDNAを含むcDNAライブラリー。

(14) (12) または(13) のcDNAライブラリーを増幅することによって得ることができる、2 次的cDNAライブラリー。

(15) (3) のcDNAライブラリーを鋳型として、前記RNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列を認識するDNA依存型RNAポリメラーゼによりRNAを合成し、mRNAライブラリーを得る方法。

(16) (15) の方法により得ることができる、mRNAライブラリー。

(17) (16) のmRNAライブラリーを発現システムに適用することによってタンパク質に翻訳する工程を含むタンパク質ライブラリーの調製方法。

(18) (17) の方法によって得ることができるタンパク質ライブラリー。

(19) 下記の工程 a) - c) を含む cDNA のサブトラクション法

a) テスターとするcDNAライブラリーを合成する工程

b) (1)、(12)、および(13) のいずれかに記載のセンス鎖cDNAライブラリーをドライバーとし、テスターcDNAをハイブリダイズさせる工程、および

c) 工程 b) においてハイブリダイズしなかったcDNAまたはハイブリダイズしたcDNAを選択する工程

【0018】

本発明によれば、5' 側において固定されたセンス鎖cDNAが提供される。固定化されたcDNAは1本鎖・2本鎖、いずれの形態であってもよい。また、2本鎖とする場合に、その全長が2本鎖である場合のみならず、部分的な2本鎖構造となっていてよい。いずれにせよ、相補鎖合成反応によって2本鎖を再構成できるものであれば特に限定されない。

本発明において、センス鎖とは遺伝情報を保持している配列を意味する。具体的には、mRNAの塩基配列がセンス鎖である。これに対してアンチセンス鎖とは、センス鎖の相補的な塩基配列を意味する。したがってmRNAを鋳型として合成された第1鎖cDNAは、アンチセンス配列を持つことになる。本発明のcDNAライブラリーとは、その配列が未知であるmRNAを鋳型として合成されたDNA（すなわちcDNA）の集合体である。なお本発明において、配列が未知とは、単に個々のRNAの配列が特定されていないことを意味する。したがって、未知とは言え実際には既知のものとも未知のものともが混在することになる。一方本発明において単にcDNAと表記する場合、ある特定のmRNAを鋳型として得られたcDNAを意味する。更に5'側の固定とは、センス鎖cDNAの5'末端のみならず、5'近傍での固定をも含むものである。

【0019】

望ましい態様においては、cDNAライブラリーにはmRNAのポピュレーションをできるだけ忠実に反映することが求められるが、目的によっては偏りを持ったものであってもかまわない。あるいは、意図的に偏った状態のライブラリーが求められる場合もある。

【0020】

また本発明において、第1鎖cDNAの3'末端に付加される人為的に付加した既知の塩基配列とは、相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドとのハイブリダイズを可能とするものであれば、任意の配列であってよい。いずれにせよ、前記人為的に付加した既知の塩基配列部分からプライムしてcDNAのセンス鎖が合成される。このとき、プライマーの5'末端を固相に固定しておくことによって、合成される第2鎖cDNAは固定化されたものとなる。固相にオリゴヌクレオチドを固定する方法は、いくつかの化学的な方法が公知である。

本発明の望ましい態様にあつては、前記人為的に付加した既知の塩基配列として、RNAポリメラーゼによって認識されるプロモーターや任意のタンパク質のアンチセンス配列といった機能的な遺伝子配列を選択することができる。これらの配列を利用した場合、最終的に合成されるセンス鎖cDNAライブラリーは、センス鎖cDNAの上流にこれらの機能的な配列を配置した構造となる。しかも本発明におい

ては、センス鎖5'側を固定化したことによって、完全長cDNAの構成比率を大きくすることができるうえ、センス鎖cDNAの上流に配置する配列が比較的長い場合でも、容易に目的とする構造のcDNAライブラリーを作成することが可能となる。その結果、このcDNAライブラリーをもとに転写されるRNAは、ソースとなったmRNAにおける5'側の翻訳開始点を含む領域が高い確率で再構成される。翻訳開始点を含んだRNAは、タンパク質への翻訳が可能である。このような構造を持ったcDNAライブラリーは新規であり、したがってこの構造によってもたらされるいくつかの応用技術も新規なものである。本発明によって得ることができるいくつかの特徴的な構造と、この構造によって達成される新たなcDNAライブラリーの応用技術については、後に更に具体的に述べる。

【0021】

本発明はまた、前記5'側において固定されたセンス鎖cDNAの合成方法を提供する。本発明に基づくcDNAの合成方法の望ましい態様においては、完全長cDNAを多く含む新規な固定化cDNAライブラリーを提供することができる。このような本発明による固定化cDNAライブラリーの合成方法についても、以下により具体的に記載する。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明のcDNAは、センス鎖の5'末端が固相に固定されている。このような構造のcDNAは、第1鎖cDNAの3'末端に人為的に付加した既知の塩基配列を付加する一方、前記人為的に付加した既知の塩基配列に相補的な配列を持つプライマーによって、第1鎖cDNAを鋳型に第2鎖（すなわちセンス鎖）合成するとき、前記プライマーを固定化しておくことによって得ることができる。プライマーの固定は、たとえば予め適当な固相に固定化しておくことによって達成される。固定化用の担体には、マイクロタイタープレート、プラスチックチューブ、あるいはマイクロビーズ等が用途に応じて利用できる。反応面積が広いこと、磁性キャリアとすることで磁石を使った分離が行えること等のメリットが期待できる微粒子状の担体は特に望ましい素材である。固相へのオリゴヌクレオチドの固定方法としては、たとえばクロスリンカーを使ってオリゴヌクレオチドの5'末端をプレートに共有

結合させる方法（米国特許5656462）等が公知である。あるいは、5'末端や末端に近い塩基にビオチンのような結合親和性を持つ分子を導入しておけば、これを固相化したアビジンに結合させることによって、末端部分のみならず5'末端近傍での固定が可能である。プライマーとして機能することができるかぎり、結合親和性分子の導入位置は制限されない。

【0023】

本発明において、cDNAの出発材料となるmRNAを不特定多数のmRNA（すなわちmRNAライブラリー）とすれば、cDNAライブラリーを得ることができる。mRNAライブラリーは、培養細胞や組織等を材料として公知の方法によって得ることができる。すなわち、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法(Molecular Cloning 2nd Ed., p.7.10, 1989)や、グアニジンチオシアネート-トリフルオロ酢酸セシウム法(H.Okayama et.al., Methods in Enzymology. Vol.154, p.3, 1987)等の方法が公知である。これらの方法に必要な試薬類をセットにしたキット(RNA Extraction Kit; Pharmacia製、商品名)も商業的に供給されている。本発明のcDNAは、真核生物のmRNAのみならず原核生物のmRNAや、RNAウイルスのゲノムを鋳型とすることができる。ただしこれらのRNAは真核生物とは異なりポリ(A)構造を持たない。したがって、第1鎖の合成にはランダムプライマー等を利用する必要がある。

他方、本発明において、第1鎖cDNAの3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法としては、たとえば、第1鎖cDNA合成後、第1鎖cDNAの3'末端に直接、人為的な既知の塩基配列を付加する方法、あるいは、あらかじめmRNAの5'末端に前記既知の塩基配列に対する相補配列を付加しておき、これを鋳型としてその3'末端に既知の塩基配列を有する第1鎖cDNAを合成する方法などが可能である。以下に、本発明によるセンス鎖cDNAの合成に利用することができる各方法について具体的に説明する。合成ステップに応じて、次のような順に説明を行う。

- 1：第1鎖cDNAの3'末端へ的人為的な塩基配列の付加
- 2：人為的な塩基配列を完全長mRNA特異的に導入するためのバリエーション
- 3：第1鎖cDNA（アンチセンス鎖）の合成
- 4：第2鎖cDNA（センス鎖）の合成

【0024】

【第1鎖cDNAの3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法】

第1鎖cDNAの3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法としては、たとえば、第1鎖cDNA合成後、第1鎖cDNAの3'末端に直接、人為的な既知の塩基配列を付加する（図2）ことが可能である。まず、5'末端にリン酸基を有し、かつ3'末端側でライゲーションが起こらないように構造的にブロックした、任意の配列（付加すべき塩基配列）を有するオリゴヌクレオチドを合成する。任意の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法は公知である。一方第1鎖cDNAを、5'末端がリン酸化されていないオリゴdTプライマーもしくはオリゴdTアダプターをプライマーとして合成する。両者をライゲーション反応させると、合成オリゴヌクレオチドの5'末端リン酸基と第1鎖cDNAの3'末端水酸基の間で特異的にライゲーションが起こり、前記合成オリゴヌクレオチドが第1鎖cDNAの3'末端に結合する。前記合成オリゴヌクレオチドの配列は既知なので、最終的に第1鎖cDNAの3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加したことになる。

【0025】

前記合成オリゴヌクレオチドの3'末端側をブロックする方法としては、たとえば、3'末端の残基をジデオキシヌクレオチドにしておく方法がある。あるいは、3'末端の水酸基をアミド基などに修飾しておいても良い。

第1鎖cDNAを合成後に修飾する方法に対して、鋳型となるmRNAを修飾する方法を採用することもできる。すなわち、付加すべき人為的な既知の塩基配列の相補配列を、あらかじめmRNAの5'末端に付加しておく。このmRNAを鋳型として第1鎖cDNAを合成すれば、その3'末端にはmRNAの5'末端に付加した配列の相補配列（すなわち人為的な既知の塩基配列）が付加されることになる（図3）。mRNAの5'末端に人為的な既知の塩基配列を付加するには、たとえば、合成オリゴヌクレオチドを、RNAリガーゼを用いてmRNA分子の5'リン酸基末端に付加する方法を利用することができる。合成オリゴヌクレオチドとしては、合成オリゴRNA、合成オリゴDNA-RNAハイブリッド、合成オリゴDNA等を示すことができる。第2鎖合成に先立ってRNAを分解除去する必要があるれば、いっしょに除去できるように合成オリゴヌクレオチドもRNAとしておくのが有利である。mRNAの5'末端が水酸基となって

いる場合には、リン酸基に変換することによってより効率的に合成オリゴヌクレオチドを付加することが可能である。リン酸化は、たとえばT4ヌクレオチドキナーゼ処理によって達成できる。

【0026】

〔完全長cDNA（第1鎖）の5'末端に選択的に人為的な既知の塩基配列を付加する方法〕

最初に具体例として示したいいくつかのバリエーションでは、いずれも全てのmRNAを対象として人為的な塩基配列を付加していた。これに対して、完全長mRNAのみを対象として人為的な塩基配列の付加を行う方法を採用することもできる。mRNA源が真核生物の場合、完全なmRNAの5'末端にはCAP構造と呼ばれる特異的な構造が存在する。このCAP構造に対して選択的に合成オリゴヌクレオチドを付加すれば、最終的には高い頻度で翻訳開始コドンを含むcDNAのライブラリーを作成することが可能となることが知られている。この原理を本発明に応用し、完全長cDNAをより高い割合で含むcDNAライブラリーとすることができる。すなわち、前記人為的な既知の塩基配列に対して相補的な配列を持ったオリゴヌクレオチドを用い、これをCAP構造部分特異的に付加するのである（図4）。

【0027】

CAP構造に対して選択的にオリゴヌクレオチドを付加する方法としては、アルカリ性ホスファターゼ処理を施したmRNAをタバコ酸性ホスファターゼ処理した後RNAリガーゼを用いて合成オリゴヌクレオチドを付加するオリゴCAP法 (Maruyama, S. and Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the CAP structure of eucaryotic mRNAs with oligonucleotides. Gene 138 (1994): 171-174,) が公知である。また、合成RNAに代えて合成DNA-RNAハイブリッドを用いた改良オリゴCAP法 (S. Kato et al., Gene, 150, 243-250 (1994).、加藤・関根 特開平6-153953号公報 1994年6月3日)、CAP構造に特徴的なジオールを酸化的に開裂してアルデヒド基に変換した後、3'末端にアミド基を付加した合成オリゴヌクレオチドと化学的に結合させるリンカー化学結合法 (N. Merenkova and D. M. Edwards, WO 96/34981 Nov. 7, 1996.) 等が知られている。これらの方法によれば、mRNAの5'側末端に存在するCAP構造を特異的に人為的なオリゴヌクレオチ

ドに置換することができる。こうして得られたmRNAを鋳型とすれば、第1鎖合成用プライマーで合成された第1鎖cDNAのうち、完全長のもののみがその3'側に人為的に付加した既知の塩基配列を持つことになる。

【0028】

〔第1鎖cDNA（アンチセンス鎖）〕

本発明における第1鎖cDNAの合成は、公知の方法によって実施することができる。ただし、その5'側に人為的な塩基配列を付加する方法の態様の違いによって、そのタイミングが異なるのは既に述べたとおりである。すなわち、第1鎖合成前にmRNAの段階で人為的な塩基配列を付加するのか、あるいは従来どおり第1鎖cDNA合成を行った後に人為的な塩基配列を付加するのか、という相違である。

本発明に適用することができる第1鎖の合成方法について、具体的に述べる。第1鎖の合成のバリエーションは、プライマーの選定に依存する。真核細胞由来のmRNAの全てを第1鎖として合成するときには、オリゴdTプライマーを利用する。ポリ(A)構造を持たない原核細胞生物やウイルスのRNAを材料とする場合には、ランダムプライマー等の利用を考慮すべきである。

【0029】

一般的なcDNAライブラリーはmRNAのポピュレーションを反映すること、あるいは発現している遺伝子を忠実に回収することが求められる。しかし、場合により目的とする遺伝子を積極的に絞り込む操作が意図的に加えられることもある。たとえば、サブトラクションによって特定の細胞集団に特異的に発現している遺伝子のライブラリーを調製するケースが考えられる。この他にも、たとえば3'側の配列のみが判明している遺伝子の単離を目的として、この判明している部分の配列をプライマーとして第1鎖を合成すれば、3'側の構造が類似した候補遺伝子のみで構成されたライブラリーとすることができる。あるいはまた、イムノグロブリンの可変部をコードする遺伝子では、比較的保存性の高い3'側の構造をもとに第1鎖を合成することにより、可変部遺伝子のライブラリーを得ることもできる。なおこれら第1鎖合成用のプライマーは、標的mRNAの塩基配列に対して完全に相補的である必要はない。与えられたストリンジェンシーの元で相補鎖にアニールすることができ、少なくともその3'末端が完全に相補的であれば相補鎖合成は

開始できる。

以上のような第1鎖合成用プライマーは、化学的に合成することができる。得られたプライマーをmRNAにアニールさせ、dNTP共存下で逆転写酵素を作用させれば、mRNAを鋳型として第1鎖が合成される。得られた第1鎖は、前記の人為的な塩基配列を付加するための方法のバリエーションにしたがい、様々な方法によって第2鎖合成のための鋳型として利用される。

【0030】

第2鎖cDNAの合成

本発明においては、第1鎖cDNAに対して人為的に付加した既知の塩基配列の相補配列（センス配列）をプライマーとして第2鎖の合成を行うことができる。このとき、第2鎖合成用プライマーをその5'側で固定しておけば、第2鎖cDNA（センス鎖）の5'末端が固定化される。

【0031】

先に述べた完全長cDNA特異的に人為的な配列を付加する態様においては、完全長cDNAが持つ3'側の人為的に付加した既知の塩基配列部分が特異的にアニールし、結果として理論的には完全長cDNAが特異的に固定化されることになる。本発明においては、合成された第2鎖（センス鎖cDNA）は、固相に固定されているので遊離する恐れは低いし、たとえ相補鎖を失うことがあってもオリゴdTプライマーを使って容易に2本鎖を再構成できる。こうして得られた第2鎖（センス鎖）のライブラリーは、高い頻度で翻訳開始コドンを含む完全長2本鎖cDNAライブラリーとすることができる。なおこのような方法に基づけば理論上は完全長cDNAのみで構成されたcDNAライブラリーを構成できることになる。しかし現実には、ある程度の不完全長cDNAが混在する可能性を否定できない。すなわち本発明における完全長cDNAライブラリーとは、必ずしも完全長cDNAのみで構成される必要はなく、cDNAの構成比率が高いものをも含むものである。cDNAライブラリーに占める完全長cDNAライブラリーの割合を定量的に把握するには、たとえばcDNAの塩基配列を解析して翻訳開始コドンを含む確率を推計するプログラムを利用することができる。この種のプログラムとしては、Gene Finder (Solovyev V.V., Salamov A.A., Lawrence C.B. Predicting internal exons by oligonucleotide compos

ition and discriminant analysis of spliceable open reading frames. Nucleic Acids Res.(1994) 22: 5156-63.) が公知である。あるいは本出願人による特願平9-289982は、翻訳開始コドンの予測をよりの確に実施しうる方法を開示している。

【0032】

一般的には、完全長cDNAを与えるのは理想的な条件の元であっても全mRNAのうちの一部と推測されている。不完全な長さのcDNAが混在することは、常に不利益につながるわけではない。しかし、たとえばPCRのような核酸合成反応では短い配列が優先的に合成される傾向がある。合成された短い配列は、完全長cDNAの単離等を妨げる原因になりかねないので、不完全な長さを持ったcDNAの割合を低く押さえるのが良質なcDNAライブラリーの条件といえる。

【0033】

以上のようにして本発明によるcDNAを合成することができる。公知の固定化オリゴdT法によって、第1鎖（アンチセンス鎖）の5'側を固定した固定化ライブラリーとすることもできる。しかし、こうして固定化されるcDNAライブラリーには、本発明のcDNAライブラリーとは異なり、不完全な長さを持ったものが多く含まれたものとなる。続いて、センス鎖の5'側に付加する人為的な塩基配列について述べる。

【0034】

〔人為的に付加する既知の塩基配列のバリエーション〕

本発明において固定化されるセンス鎖cDNAの5'末端の上流に人為的に付加する配列としては、任意の塩基配列を採用することができる。基本的な態様においては、第2鎖（センス鎖）合成用のプライマーとアニールすることが可能な塩基配列であれば良い。更に単なるプライマーとのアニールのみならず、この塩基配列に機能的な配列を用いた場合には、その機能に基づいて本発明によるcDNAライブラリーをさまざまな形で応用することができる。以下に人為的な既知の塩基配列のバリエーションと、その応用について具体的に述べる。

【0035】

なお、塩基配列を人為的に付加するのにあたり、付加方法にはいくつかの態様

を示すことができる。たとえば、それはアンチセンス鎖の3'末端に付加した配列として与えられる。この配列にアニールしてセンス鎖合成用のプライマーとなる配列が、すなわちセンス鎖5'末端上流に人為的に付加する配列となる。このプライマーには、更にその上流に伸びる領域を与えることができる。この領域は第1鎖にアニールする領域よりも上流に伸びているので第1鎖とのアニールはしないが、第2鎖の5'側を構成することになる。この場合、アンチセンス鎖の3'末端部分はプライマーの一部に対してアニールする形をとるが、プライマーの3'側がアンチセンス鎖にアニールすることには変わりはないので相補鎖合成は進行する。この上流に突出した配列については1本鎖状態のままであることもできる。あるいは、機能的な塩基配列が2本鎖とならなければ機能できないとき（たとえば図6におけるプロモーター配列のように）には、この状態で第1鎖（アンチセンス鎖）側の相補鎖合成を更に進めることにより、付加すべき機能的な配列に相補的な塩基配列が合成されて2本鎖を完成することができる（後述）。これらの態様によれば、長い塩基配列であっても容易に付加することができる。なおここで述べた、第1鎖とのアニールのための領域、あるいは上流に伸びる領域といった特定の領域は、あくまでも説明のためのものである。したがって、現実には機能的な塩基配列の一部が第1鎖とのアニールのための領域としても機能し、残りの部分がその上流に位置するといった構成となる。

【0036】

人為的に付加する既知の塩基配列として有用な第一のバリエーションは、RNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターである（図5）。その他、任意のタンパク質をコードするセンス鎖の配置によって融合タンパク質をコードするcDNAライブラリーの構成も可能である。まず、プロモーターとの組み合わせについて説明する。

【0037】

本発明における人為的に付加した既知の塩基配列としてRNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターを用いた場合、プロモーターをセンス鎖cDNAの上流に配置することができる。このプロモーターが、インビトロでのRNA合成を可能にするRNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列であ

れば、RNAポリメラーゼによりcDNAを鋳型としたRNAの転写が行われる。このような応用を可能とするプロモーターには、T7プロモーター配列(Pribnow, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72/3:784-788, 1975)、T3プロモーター配列(Adhya, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78/1:147-151, 1981)、およびSP6プロモーター配列(Brown, J.E., Nucleic Acids Res. 14/8:3521-3526, 1986)を示すことができる。これらのプロモーターは、必ずしも全配列が必要なわけではなく、プロモーター活性の維持に必要なドメインのみを利用すれば良い。各プロモーターの必須配列(センス鎖)を以下に示す。この塩基配列はセンス鎖のものなので、第1鎖cDNA(アンチセンス鎖)の3'末端に付加するには、下記配列に対するアンチセンス配列となるようにする。

【0038】

T7:TAATACGACTCACTATAGGG

T3:AATTAACCCTCACTAAAGGG

SP6:ATTTAGGTGACACTATAG

【0039】

本発明に基づいてインビトロでRNAの転写を行うためには、以下のような操作を行う。すなわち、プロモーターを上流に配置した本発明によるcDNAに、RNAの合成に必要なリボヌクレオチド(rNTP)を加え、用いたプロモーターを認識するRNAポリメラーゼを作用させるのである。反応液にはリボヌクレアーゼの混入を避け、更に望ましくはリボヌクレアーゼ阻害剤を添加しておくが良い。30分から数時間反応させれば、 μ gオーダーのRNAを転写させることができる。転写終了後に固相を分離すれば、鋳型としたcDNAは簡単に分離することができる。また分離したcDNAが洗浄後に簡単に再利用できることも本発明の大きな特徴である。他方、転写されたRNAは、フェノール・クロロホルムで抽出しエタノール沈殿させることによって酵素や未反応の基質rNTPから分離・回収される。鋳型としたcDNAがライブラリーであれば、mRNAをライブラリーとして得ることが可能である。

【0040】

このとき、本発明によるcDNAライブラリーをそのまま鋳型に用いても良いが、二次的なcDNAライブラリーを鋳型とすることもできる。すなわち、本発明による

cDNAライブラリーをプライマリーライブラリーとしてPCR増幅したセカンダリーライブラリーを鋳型として利用するのである。なおプライマリーライブラリーとは、2次的なライブラリー（すなわちセカンダリーライブラリー）を合成するときにその鋳型として機能するライブラリーを表す用語である。プライマリーライブラリーは、もとのmRNAのポピュレーションを比較的忠実に反映している反面、1種類のmRNA当たりのcDNAが少ない可能性がある。つまり、RNA合成のための鋳型の数が少ないのである。RNAポリメラーゼの転写能力には限りがあるので、鋳型を多くすることによってより多量の転写生成物が期待できるようになる。セカンダリーライブラリーを得るには、本発明のcDNAライブラリーに対して、オリゴdTプライマーと、第1鎖に付加した人為的な既知の塩基配列に相補的な配列を持つプライマーとでPCRを行う。このときプライマーのいずれかを固定化しておけば、セカンダリーライブラリーも固定化した状態で得ることができる。センス鎖5'側で固定化することによって得ることができる本発明によるcDNAライブラリーは、鋳型の段階で完全長cDNAの割合が高い。したがって、ライブラリーとしての一定の多様性を保った状態の2次的なライブラリーを再現性良く得るためのプライマリーライブラリーとして利用する場合にも有用である。本発明においては、このように完全長cDNAの割合を維持した状態で2次的なライブラリーを与えうるプライマリーライブラリーを特にマスターライブラリーと呼ぶ。

【0041】

なお本発明においては、センス鎖cDNAの上流にプロモーターを配置できるので、転写されるRNAはセンス鎖RNA（すなわちmRNAと同じ配列）となる。したがって、こうして転写されたRNAが翻訳開始点を含んでいれば、適当な発現システムに適用することにより、そのままタンパク質の発現が行われる。本発明における発現システムとは、前記RNAに基づいてタンパク質への翻訳を行うことができる系を意味する。それはインビトロであってもインビボであっても良い。本発明に基づくcDNAでは、大きく分けて2種類の翻訳開始点が存在する可能性がある。1つは鋳型となったmRNAに由来するものであり、いまひとつは人為的に付加した塩基配列が提供する翻訳開始点である。翻訳開始点がmRNAに由来する場合には、そのcDNAは完全長cDNAである可能性が非常に高い。一方、翻訳開始点が人為的に付加

した塩基配列によって与えられるケースについては、後に本発明によるcDNAを融合タンパク質として発現させる態様として詳細に述べる。いずれにせよ、翻訳開始点を含む場合には、cDNAから転写されたRNAをもとにタンパク質への翻訳が可能である。cDNAがライブラリーであれば、それを元にして得られるタンパク質もライブラリーを構成する。本発明は、こうして得ることができるタンパク質ライブラリーをも提供するものである。

【0042】

cDNAライブラリーを元に得られたタンパク質は、cDNAライブラリーの状態を反映したタンパク質ライブラリーとなる。インビトロで転写されたRNAをもとにタンパク質に翻訳が可能な発現システムとしては、ウサギの網状赤血球を溶血させたものや、コムギ胚抽出液などを利用した発現用のキットが市販されているので、これを利用すれば良い。これらの無細胞発現系によれば、タンパク量としては微量ながら、タンパク質を溶解した形で、しかも天然の構造に近い状態で得ることができる。得られたタンパク質ライブラリーは、薬剤標的のスクリーニング源として、あるいは発現しているタンパク質の変化から細胞状態を調べるための解析材料として利用することができる。

【0043】

本発明のcDNAライブラリーから転写されたセンス鎖RNAライブラリーは、細胞内で直接発現させることもできる。センス鎖RNAを細胞に導入すれば、細胞内でそのセンス鎖RNAがコードしている遺伝子の生物活性を発現させることが可能である(Henle, K.J. et al. Expression of thermotolerance following microinjection of poly(A) RNA isolated from thermotolerant CHO cells. Int. J. Hyperthermia, 6(6):1041-1051, 1990)。細胞にRNAを導入する手段としては、一般的にはマイクロインジェクションが適当であるが、リポフェクション、パーティクルガンといった核酸分子を細胞内に導入することを可能にする方法であれば、いずれの方法でも利用することができる。細胞に導入されたセンス鎖RNAを鋳型に、細胞内のタンパク質合成系が働いて導入した遺伝子がコードするタンパク質を生産し、それらの生物活性を発現する。

たとえば発生における一過的な段階における細胞、あるいは限られた病態組織

などを材料に、その生理状態が細胞に与える影響を調べる実験系や、そうした生理状態において作用する薬物などをスクリーニングするためのアッセイ系などを構築しようとする場合、その材料には量的な限りがある。そのため再現性良く、また大量に調製することは非常に困難となる。このような場合において、対応する生理状態の細胞や組織から、本発明に基づいて合成したcDNAライブラリーが有用である。すなわち、これをマスターライブラリーとして得られるRNAライブラリーを適当な細胞系に導入することにより、目的とする細胞の状態を擬似的に再現したモデル系の構築が可能となる。本発明のcDNAライブラリーによって、必要なアッセイ系を容易にかつ再現性良く、提供することができるのである。

【0044】

続いて、人為的に付加する塩基配列として他のタンパク質をコードする遺伝子を配置する態様について述べる。本発明においては、前記人為的に付加した既知の塩基配列として他のタンパク質をコードする遺伝子を配置することができる。特に前記プロモーター配列を配置する態様において、cDNAの上流に別のタンパク質をコードする遺伝子を連結した場合には、cDNAにコードされるタンパク質（未知）が、組み合わされたタンパク質との融合タンパク質として発現することになる。組み合わせるべきタンパク質としては、たとえば、特異的な結合活性を持ったタンパク質、検知可能なシグナルを与えるタンパク質、あるいは生物学的な活性を持ったタンパク質等を示すことができる。

特異的な結合活性を持ったタンパク質としては、プロテインA、ヒスチジンタグ、あるいはHAタグといった、公知の結合活性を備えたタンパク質を例示することができる。これらのタンパク質と融合した本発明のタンパク質ライブラリーは、対応するリガンドによって固相に捕捉することができる。捕捉されたライブラリーは、リガンドやレセプター、あるいはシグナル伝達系のスクリーニングに利用することができる。

【0045】

また検知可能なシグナルを与えるタンパク質としては、Green Fluorescent Protein (GFP) のような蛍光性タンパク質、あるいは β ガラクトシダーゼやペルオキシダーゼのような酵素タンパク質等が例示できる。これらのタンパク質と融合

した本発明のタンパク質ライブラリーは、候補化合物との結合反応を行わせることによって、やはりリガンドやレセプター、あるいはシグナル伝達系のスクリーニングに利用することができる。

【0046】

これらのタンパク質をコードする遺伝子を前記プロモーターとcDNAの間に配置する場合も、先に述べたのと同様の手法によってcDNAのライブラリーを得ることが可能である。ただし、場合によってはmRNAに対してかなり長い塩基配列を付加することになる。付加配列が長くなる場合には、たとえばmRNAに付加する配列は他のタンパク質をコードする長い配列でなければならないが、これを捕捉する固定化プローブはプロモーター部分に対応する部分のみでも良い。あるいは、まず付加すべき長い配列の3'側のみを付加し、残りの部分を第2鎖（センス鎖）合成時に補充する方法（図6）を採用することもできる。この図においては、第1鎖には付加すべき配列の一部が与えられているのみである。残りの部分は固定化された第2鎖合成用プライマーの一部として補充されている。この態様の第2鎖（センス鎖）合成時には、第2鎖（センス鎖）の合成反応に並行してアンチセンス鎖が固定化されたプライマーを鋳型として更に3'方向に伸長する反応が進むことになる。

【0047】

タンパク質をコードする遺伝子の配列としては、翻訳開始可能なコドンを含み、同じフレームで3'末端に結合した遺伝子との融合タンパク質が形成されるように、終止コドンを含まない形でのオープンリーディングフレームが必要である。更に発現可能な融合タンパク質遺伝子として固定化するためには、センス鎖cDNAの5'末端がタンパク質をコードする領域の中にあることが望ましく、したがってmRNA源としてはむしろ不完全長のものが適している。結合したセンス鎖cDNAの5'末端がタンパク質をコードする領域の中にあれば、3分の1の確率でインフレームの融合タンパク質遺伝子を形成することになる。

【0048】

さて、この原理を利用すれば、不完全長のcDNA（すなわち翻訳開始点を持たない）を発現可能な形で回収することが可能である。すなわち、人為的に付加する

既知の塩基配列として、少なくとも翻訳開始点を含むものを用意する。これに不完全長cDNAを連結した構造とするのである。言い換えれば、人為的に翻訳開始点のみを与えることになる。こうして得られたcDNAを転写したRNAは、前記融合タンパク質をコードする場合と同様に1/3の確率でインフレームのアミノ酸配列をコードするものとなる。

【0049】

本発明のcDNAライブラリーがセンス鎖を固定したものであることから、これをドライバーとしてcDNAのサブトラクション法が可能となる。つまり、任意の方法によって合成した第1鎖cDNAをテスターとして本発明によるcDNAライブラリーにハイブリダイズさせれば、第1鎖cDNAにのみ含まれている配列を持ったcDNAはハイブリダイズできないで液相に残る。これを固相から分離することによって、サブトラクションを容易に行うことができる。本発明のcDNAライブラリーをコントロールとして用いれば、いろいろな対象に対してサブトラクションを繰り返し実施することができ、再現性の高い研究を行うことができる。具体的には、たとえば正常細胞に由来するcDNAライブラリーを本発明に基づいて固相化しておく。このcDNAライブラリーを用いて、薬剤候補化合物で処理した細胞のcDNAをサブトラクションすれば、薬剤候補化合物のスクリーニングを行うことができる。あるいは、癌細胞のような異常細胞のcDNAのサブトラクションを行えば、異常細胞に特異的な遺伝子を選択することもできる。また、肝細胞に由来するcDNAライブラリーを固定化して、その他の臓器に由来するcDNAをサブトラクトすることにより、臓器特異的な遺伝子の選択が可能である。いずれのケースにおいても、本発明によるcDNAライブラリーは、センス鎖を固定しているので、第1鎖cDNAのサブトラクションを可能とする点で、公知のサブトラクション法にはない作業効率を達成できる。しかも、望ましい態様においては完全長cDNAの多様性を高度に維持していることから、より確実なサブトラクションを期待できる。また、固相化されていることから繰り返し利用できるという利点がある。

【0050】

本発明のcDNAライブラリーは、これをソースとして遺伝子のクローニングを進めることもできる。たとえば、本発明のcDNAライブラリーをもとにインビトロで

mRNAライブラリーを合成し、これを通常の遺伝子クローニング方法によってスクリーニングすることができる。このようなスクリーニング方法を実施するためのライブラリーを商業的に供給する場合には、次のような態様が考えられる。

【0051】

- ・本発明のcDNAライブラリーに基づいて合成したmRNAライブラリー
- ・そのmRNAから合成したcDNAライブラリー
- ・本発明のcDNAライブラリーに基づいて合成したDNAライブラリー

あるいは、得るべき遺伝子の構造が既に判明している場合には、本発明のcDNAライブラリーから直接PCRにより増幅する、あるいは本発明のcDNAライブラリーから合成されたmRNAを鋳型としてRT-PCRを行うといったような方法によって目的の遺伝子を得ることができる。

【0052】

いずれにせよ、繰り返し述べているように、このような様々な態様が可能となるのは、本発明のcDNAライブラリーが効率良く完全長cDNAを固定化できることから、完全長cDNAの多様性に富んだ1次的なライブラリーを作成できるためにほかならない。公知の方法では完全長cDNAの多様性が高い固定化cDNAライブラリーを作成することが困難であり、これをマスターライブラリーとして2次的、あるいは3次的なライブラリーを合成すると完全長cDNAの多様性が著しく低下してしまい、遺伝資源として必要な品質を維持できないのである。これに対して本発明においては、試料に由来する完全長mRNAと同等のcDNA（あるいはmRNA）ライブラリーを原理的には無限に合成することができる。つまり本発明によるcDNAライブラリーは、クローニング用のマスターライブラリーとして望ましい特徴を備えたものであるということができる。

【0053】

以下に、本発明に基づいてセンス鎖の5'側を固定したcDNAライブラリーを構築し、これをプライマリーライブラリーとして2次的なライブラリーやmRNAライブラリーを調製する操作について、具体的な操作を例示する。この例においては、mRNAの5'側に人為的な配列を付加する方法として、オリゴCAP法を応用したが、本発明はこの具体例に限定されるものではない。なおオリゴCAP法の基本的な操

作については、鈴木穰・菅野純夫(1996)「cDNAクローニング」(羊土社) pp46-51に記載された方法に準じる。

【0054】

細胞試料から抽出した5 μ g(84 μ L)のポリ(A)⁺RNAに、以下の試薬を加え、37℃で30分間インキュベートする。反応液をフェノールクロロフォルム処理(2回)し、RNAをエタノール沈でんにより回収する。

10 μ L の10×BAP緩衝液(寶酒造製)

3 μ Lのアルカリフォスファターゼ(細菌由来、寶酒造製)、および

3 μ Lのリボヌクレアーゼインヒビター

回収した沈でんを75 μ Lの蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、37℃で30分間インキュベートする。反応液をフェノールクロロフォルム処理し、RNAをエタノール沈でんにより回収する。

20 μ Lの5×TAP緩衝液、

3 μ Lのタバコ酸性ピロフォスファターゼ(Shinshi, H. et al. Biochem. 15, 2185, 1976)、および

2 μ Lのリボヌクレアーゼインヒビター(寶酒造製)

*5×TAP緩衝液:

250mM 酢酸ナトリウム(pH5.5)

5mM EDTA(pH8.0)

50mM 2-メルカプトエタノール

【0055】

回収した沈でんを6.4 μ Lの蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、16℃で3時間インキュベートする。反応液をフェノールクロロフォルム処理し、RNAをエタノール沈でんにより回収する。ここで添加するオリゴRNAが、付加すべき人為的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドである。その塩基配列は、たとえば5'末端近傍にSfiI切断配列を有し、全体としてストリンジェントな条件下で相補鎖とのアニールが可能な鎖長を持った合成オリゴRNAとする。

10 μ Lの10×RNA Ligation Buffer(寶酒造製)、

20 μ Lの25mM MgCl₂、

2.1 μ Lの24mM ATP、
4 μ LのオリゴRNA(100ng/ μ L)、
50 μ Lの50%ポリエチレングリコール8000、
5 μ LのT4RNAリガーゼ(寶酒造製)、および
2.5 μ Lのリボヌクレアーゼインヒビター(寶酒造製)

【0056】

回収した沈でんを50 μ LのTE緩衝液に溶解し、スパンカラム(Pharmacia Size Sep 400)で未反応のオリゴRNAを除く。得られたRNA分画をエタノール沈でんで回収する。ここまでの操作によって、完全長mRNAの5'側特異的に人為的な配列が付加される。次いで、この人為的な配列を付加したmRNAを鋳型として第1鎖cDNAを合成する。回収したRNAを21 μ Lの蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、16℃で1時間、次いで42℃で1時間インキュベートする。このとき用いるオリゴdTアダプターは、その5'末端にSfiI認識配列を持つものとする。

10 μ Lの5×First Strand Buffer(Gibco BRL)、
6 μ Lの0.1M DTT、
8 μ Lの5mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP混合溶液、
2 μ LのオリゴdTアダプター(5pmol/ μ L)、
2 μ LのSuperscript II(Gibco BRL)、および
1 μ Lのリボヌクレアーゼインヒビター(寶酒造製)

【0057】

反応液に更に50 μ Lの蒸留水を加え、フェノールクロロフォルム処理し、2 μ Lの0.5M EDTAと15 μ Lの0.1N NaOHを加え、更に65℃で1時間インキュベートする。反応後の反応液に20 μ Lの1M Tris-HCl(pH7.8)を加え、スパンカラム(Pharmacia Size Sep 400)により、第1鎖cDNAを精製する。cDNAをエタノール沈でんにより回収し、80 μ Lの蒸留水に溶解する。ここで回収される第1鎖cDNAは、その3'側にmRNAに対して付加した人為的な塩基配列に相補的な塩基配列を備えている。この第1鎖cDNAを鋳型として、本発明による固定化cDNAライブラリーの合成を行う。

第1鎖cDNAの3'末端に付加された配列に相補的なオリゴDNAを固定化したチュー

ブ(GenePlates, AGCT Inc.) に、第1鎖cDNA(80 μ L)を移す。65℃で10分間、続いて12℃で30分間インキュベートして固定化オリゴDNAとアニールさせた後、以下の試薬を加え、30℃で30分間インキュベートする。

10 μ Lの5×T4 ポリメラーゼBuffer (寶酒造製)、

8 μ Lの5mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP混合溶液、および

2 μ LのT4 DNAポリメラーゼ(寶酒造製)

反応後、上清を除き蒸留水で洗浄して50 μ LのTE緩衝液を加える。このチューブの内壁には、第2鎖cDNA (センス鎖cDNA) が、その5'側を固定された状態で結合しており、本発明による固定化cDNAライブラリーを構成している。次いで、このcDNAライブラリーをプライマリーライブラリーとする二次的なcDNAライブラリーの合成操作について記載する。

【0058】

本発明による固定化cDNAライブラリーに以下の試薬を加え、95℃で5分間、「95℃で1分、58℃で1分、72℃で10分」を15サイクル、72℃で10分間の条件でDNAを増幅した後、4℃に冷却する。5'側プライマーにはチューブ内に固定したオリゴDNAと同じ配列を、また3'側プライマーにはオリゴdTプライマーを利用すれば良い。

52.4 μ Lの蒸留水、

30 μ Lの3.3×PCR Buffer (Perkin-Elmer)、

8 μ Lの2.5mM dNTP混合溶液、

4.4 μ Lの2.5mM 酢酸マグネシウム、

1.6 μ Lの5'-プライマー (10pmol/ μ L)、

1.6 μ Lの3'-プライマー (10pmol/ μ L)、および

2 μ Lの GeneAmp DNA Polymerase (Perkin-Elmer)

上清を新しいチューブに移し、フェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを89 μ Lの蒸留水に溶解する。これに以下の試薬を加え、50℃で3.5時間インキュベートする。

10 μ LのBuffer #2 (New England Biolabs)、

1 μ Lのウシ血清アルブミン(×100) (New England Biolabs)、および

2 μ LのSfiI (New England Biolabs)

反応液をフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを50 μ LのTE緩衝液に溶解する。アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルからの切り出しにより短い断片を除去し、回収したDNAを20 μ Lの蒸留水に溶解する。このDNAをDraIIIで切断したpME18SFL3ベクター (GenBank Accession Number: AB009864) 断片の粘着末端—前記SfiIで切断したDNA断片に残る粘着末端に相補的—とT4 DNAリガーゼでライゲーションさせ、大腸菌に形質転換する。こうして、本発明のcDNAライブラリーをプライマリーライブラリーとする二次的なベクターライブラリーを構築することができる。あるいはまた、前記人為的に付加する配列として、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を利用した場合には、インビトロ転写反応によってセンス鎖RNAライブラリーの合成が可能である。以下にRNAライブラリーの合成について述べる。

【0059】

本発明による固定化1次ライブラリーに以下の試薬を加え、37℃で10分間インキュベートする。反応後の上清を新しいチューブに移し、フェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを50 μ Lの蒸留水に溶解する。このとき回収されるのは、本発明のcDNAを鋳型として転写されたRNAライブラリーに他ならない。

76.8 μ Lの蒸留水、
10 μ Lの10×T7 Pol. Buffer (寶酒造製)、
8 μ Lの5mM rATP、rUTP、rCTP、rGTP混合溶液、
4.4 μ Lの2.5mM 酢酸マグネシウム、および
2 μ LのT7 RNA ポリメラーゼ (寶酒造製)

【0060】

【発明の効果】

本発明は、センス鎖cDNAの5'側において固定されたまったく新規な構造のcDNAを提供する。この特徴によって、完全長cDNAの固定化効率が高く、完全長cDNAの多様性に富んだ固定化cDNAライブラリーの提供を可能とする。公知の固定化cDNAライブラリーでは、アンチセンス鎖 (第1鎖) 合成用プライマーを固定化する方法

でしか固定化できないので、不完全なcDNAを多く含むライブラリーとなっていた。本発明では、第1鎖cDNA（アンチセンス鎖）の3'側に人為的な既知の塩基配列を付加することにより、結果として高い効率で完全長cDNAを固定化し、完全長cDNAの多様性に富んだ固定化cDNAライブラリーを合成することが可能となった。

【0061】

また本発明における人為的に付加した既知の塩基配列には、インビトロでRNAの合成を可能とするプロモーターや、機能性タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。しかも、これら的人為的に付加した既知の塩基配列はセンス鎖（第2鎖）の上流に配置されるため、様々な用途をもたらす。たとえばプロモーター配列を利用した場合には、本発明による固定化cDNAライブラリーを鋳型とするmRNAライブラリーの調製が可能である。しかも本発明のcDNAライブラリーは固定化されていることから、回収・再利用することにより原理的には同等の品質のRNAを無限に生成することも可能である。生成した翻訳開始コドンを含むセンス鎖RNAは、生物体に導入することにより細胞内でその遺伝子の生物活性を発現させることが可能である。たとえば、特定の状態の生物体から作成した固定化発現cDNAライブラリーから作成した発現RNAライブラリーは、その状態で発現している遺伝子群に対する生物体の応答を研究解析するための有用な材料になり得る。

【0062】

また本発明においてはここで得られるRNAがセンス鎖であることから、インビトロでのタンパク質合成が可能となる。翻訳開始コドンを含むcDNAライブラリーを固定化できることから、インビトロのタンパク質合成反応により、タンパク質ライブラリーを作成することが可能である。生成したタンパク質ライブラリーは、たとえば、プロテオーム解析のための有用な研究材料となるほか、医薬品をはじめとする種々の生理活性タンパク質の探索源としても利用可能である。インビトロ翻訳系は、微量のタンパク質しか与えないが、一方で生体内のタンパク合成系と酷似しているため天然の状態に近い状態でタンパク質を発現する。ファージライブラリー等で発現できるタンパク質分子の大きさや種類に制限があるのに対し、インビトロ発現系ではそうした制約が少なく、ライブラリーのようなより広範

な遺伝子を対象とした発現に適している。更にプロモーター配列とcDNAの間に、特定のタンパク質をコードする遺伝子を挿入しておけば、固定化cDNAライブラリーを鋳型として特定のタンパク質との融合タンパク質遺伝子ライブラリーを作成することも可能となる。

【0063】

本発明によって提供されるcDNAライブラリーは、これをプライマリーライブラリーとして2次的cDNAライブラリーの合成が可能である。本発明のcDNAライブラリーをプライマリーライブラリーとすれば、オリゴdTと人為的に付加した既知の塩基配列をプライマーとするPCRを行うことより理論的にすべてのcDNAが合成される。このようにして合成されたcDNAの集合体は、プライマリーライブラリーにおける完全長cDNAのポピュレーションを反映した良質な2次的ライブラリーを与える。しかも本発明のライブラリーは固定化されているので理論的には何度でも再利用することができる。つまり、継続的に完全長cDNAを多く含む均質なライブラリーの提供が可能となる。公知の方法に基づいて合成されたcDNAライブラリーでは、完全長cDNAがわずかしか含まれないため、mRNAにおけるポピュレーションを維持しながら増幅することが困難とされている。したがって、本発明のcDNAライブラリーはcDNAの研究を進める上できわめて有効な手段といえる。

以上のように、センス鎖RNAライブラリーの効率的な生産方法として、さらにそのcDNAがコードするタンパク質によるライブラリーを構成するための手段として、更に品質の安定した完全長cDNAライブラリーを生産する手段として、本発明の産業上の有用性はきわめて高い。

【0064】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Immobilized cDNA Library

<130> promoters

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Bacteriophage T7

<400> 1

taatacgact cactataggg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Bacteriophage T3

<400> 2

aattaaccct cactaaaggg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Bacteriophage SP6

<400> 3

atttaggtga cactatag

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。

【図 2】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。第1鎖cDNAの3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する態様を示す。

【図 3】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。mRNAの5'末端に人為的な既知の塩基配列の相補配列を付加する態様を示す。

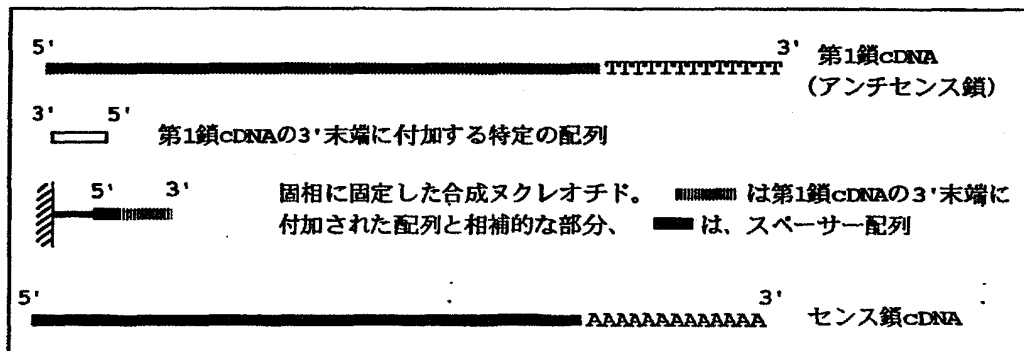
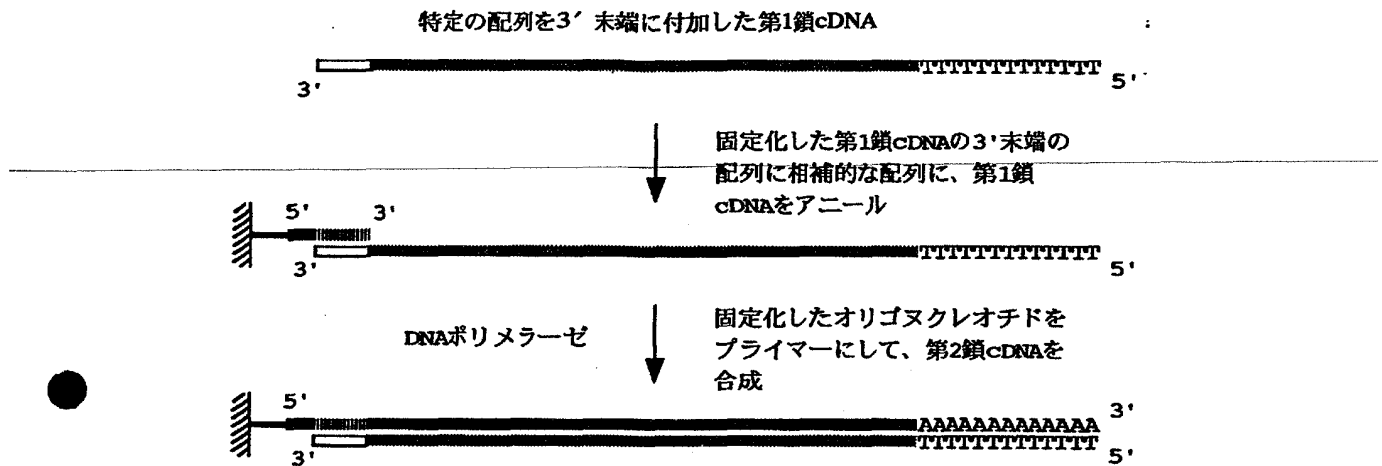
【図 4】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。mRNAの5'末端のCAP構造に人為的な既知の塩基配列の相補配列を付加する態様を示す。5'末端のCAP構造特異的な反応を利用することにより、完全長cDNAを特異的に固定化できることを示す。

【図 5】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。既知の配列としてプロモーターを用いたとき、センス鎖の上流への配置が可能となることを示す。

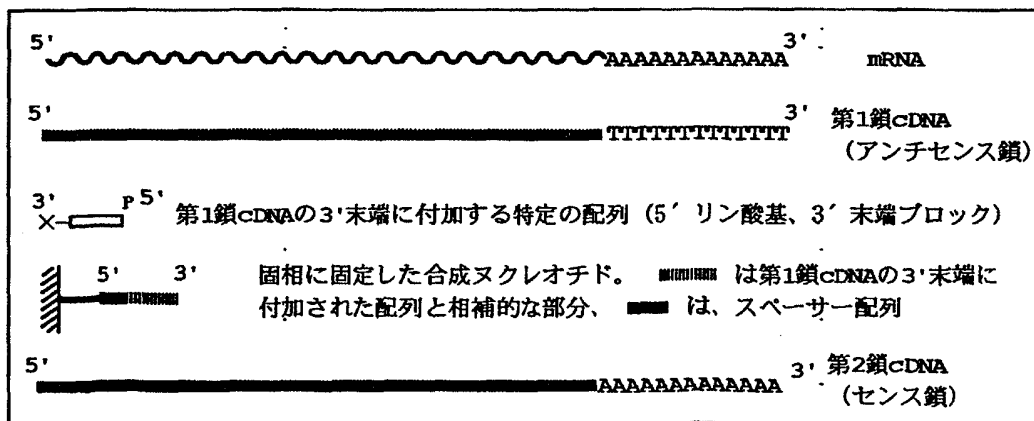
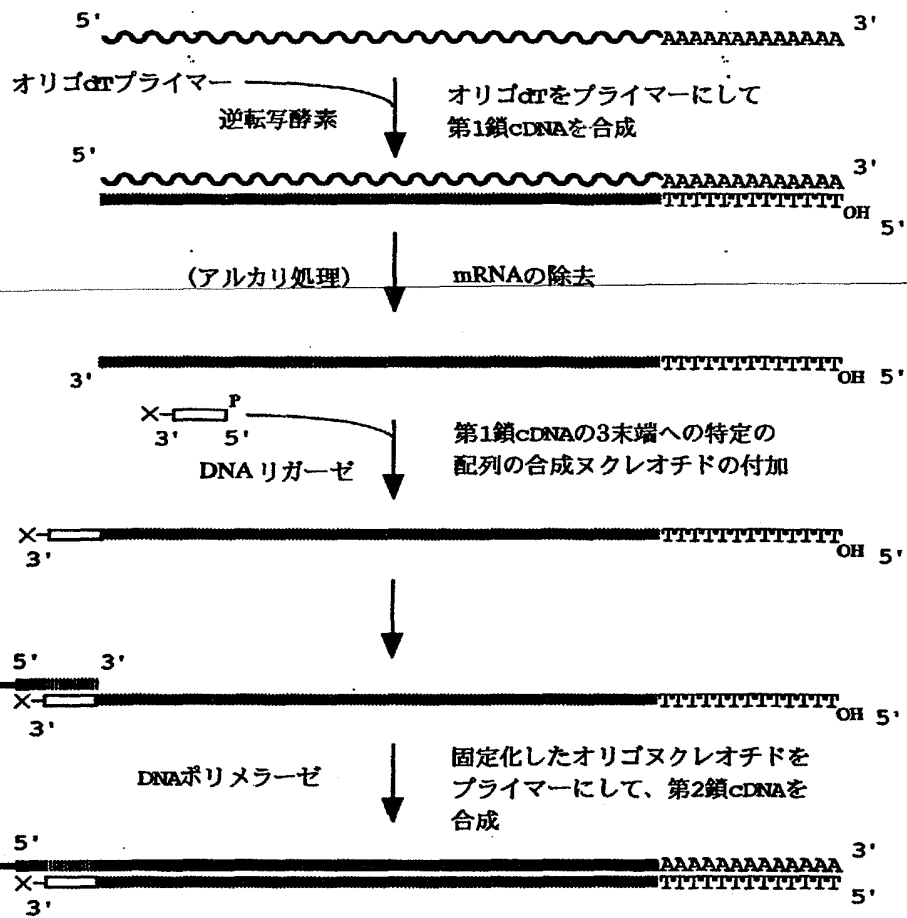
【図 6】 本発明によるセンス鎖の5'側を固定したcDNAの合成原理を示す模式図。長い塩基配列を付加する場合のバリエーションを示す。

【書類名】 図面

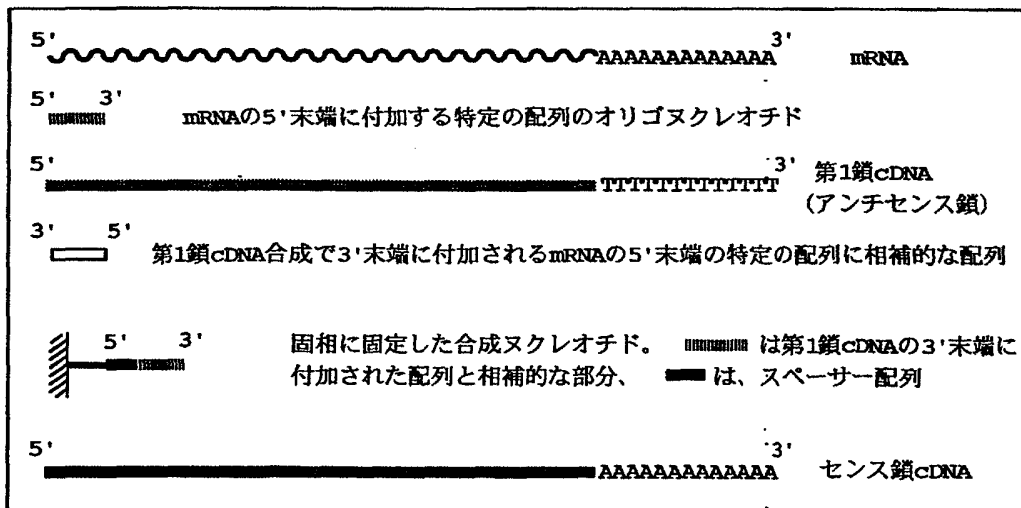
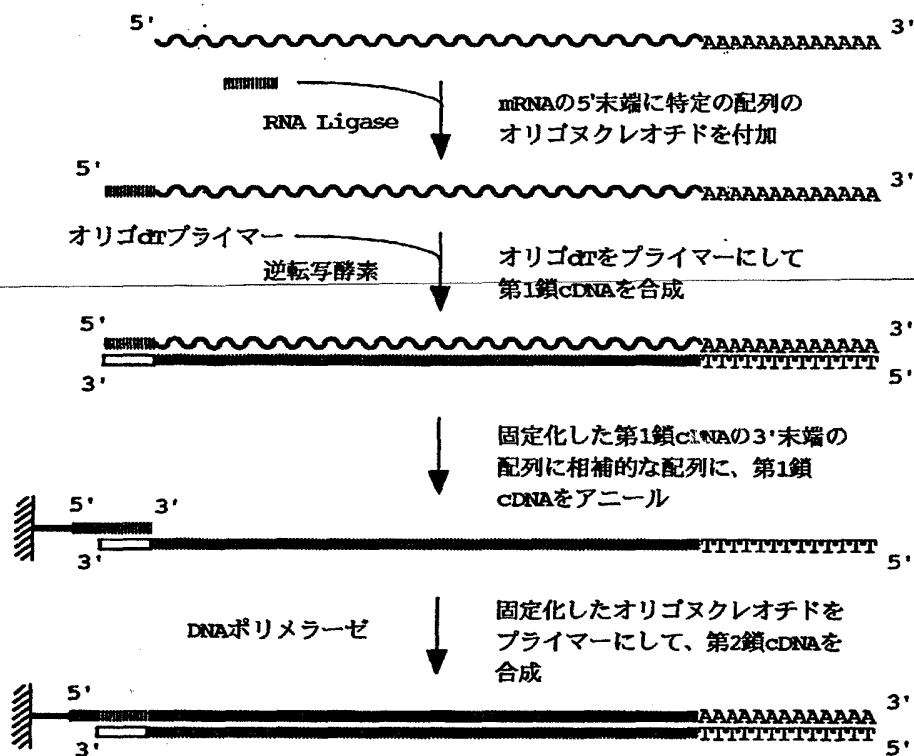
【図1】



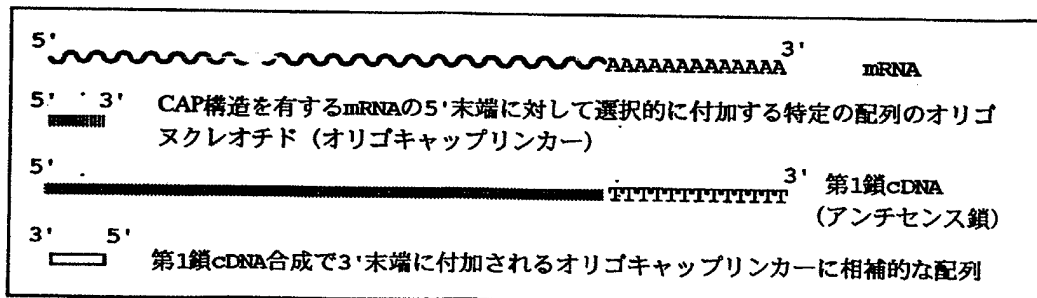
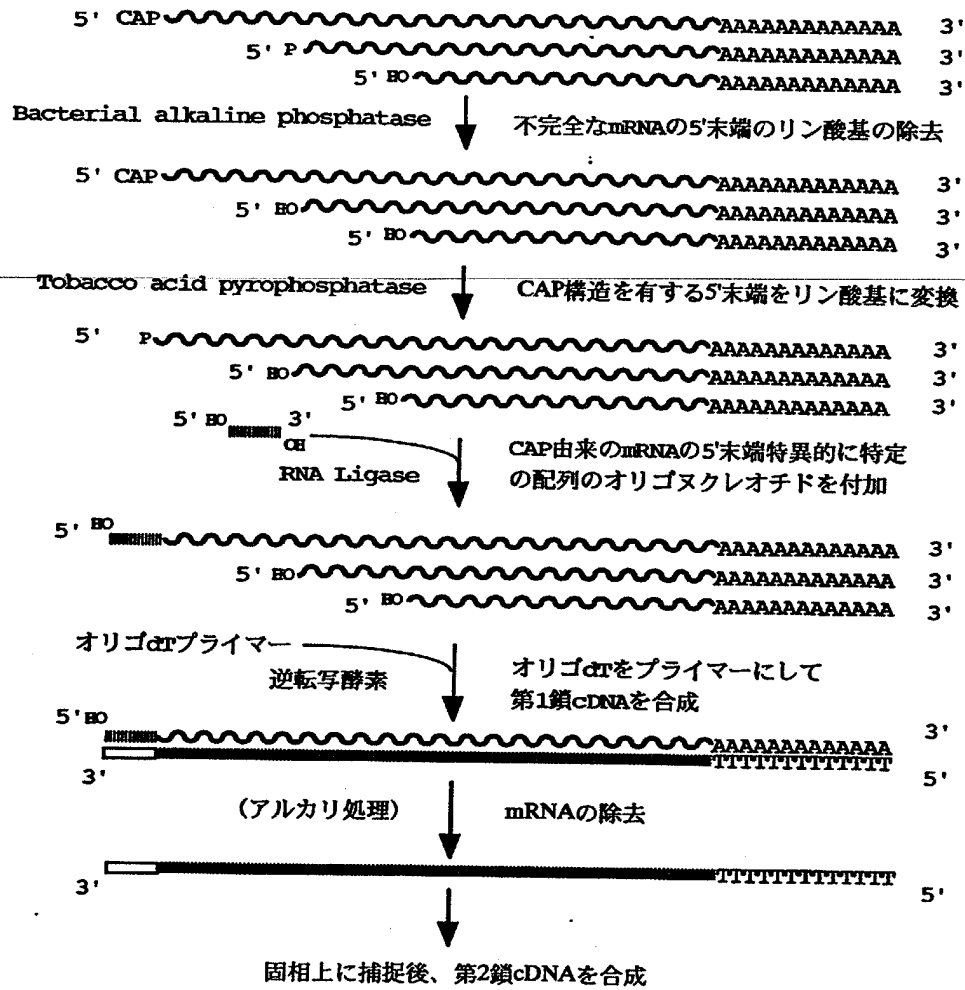
【図2】



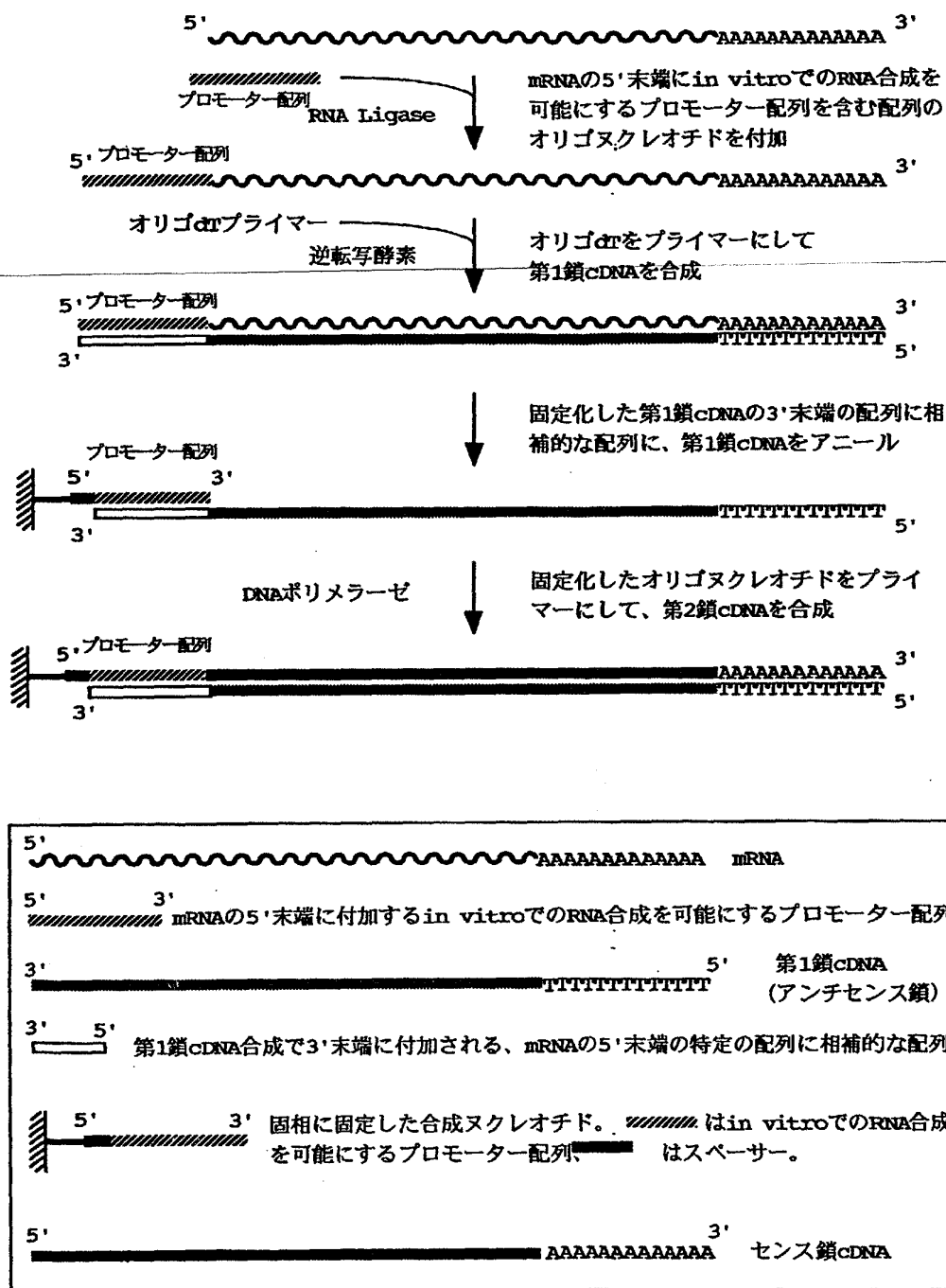
【図3】



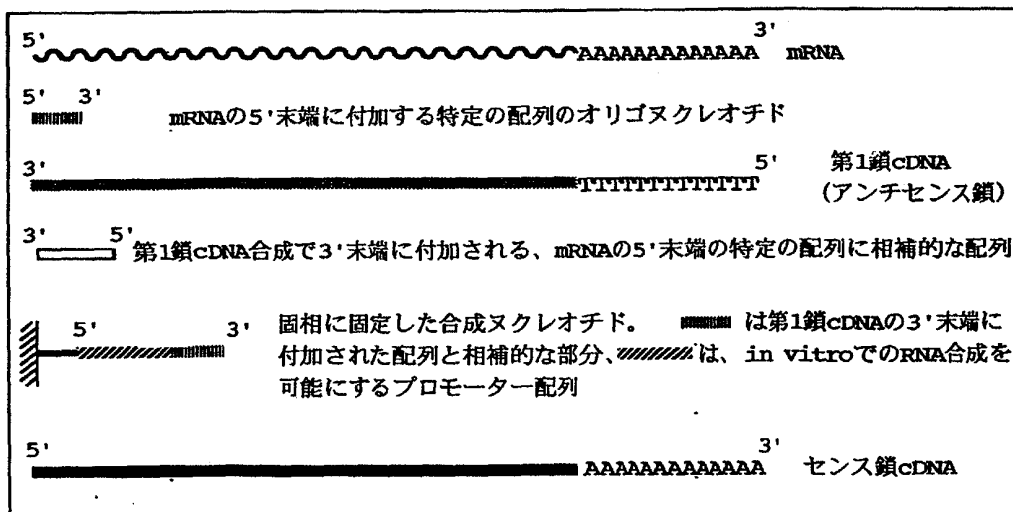
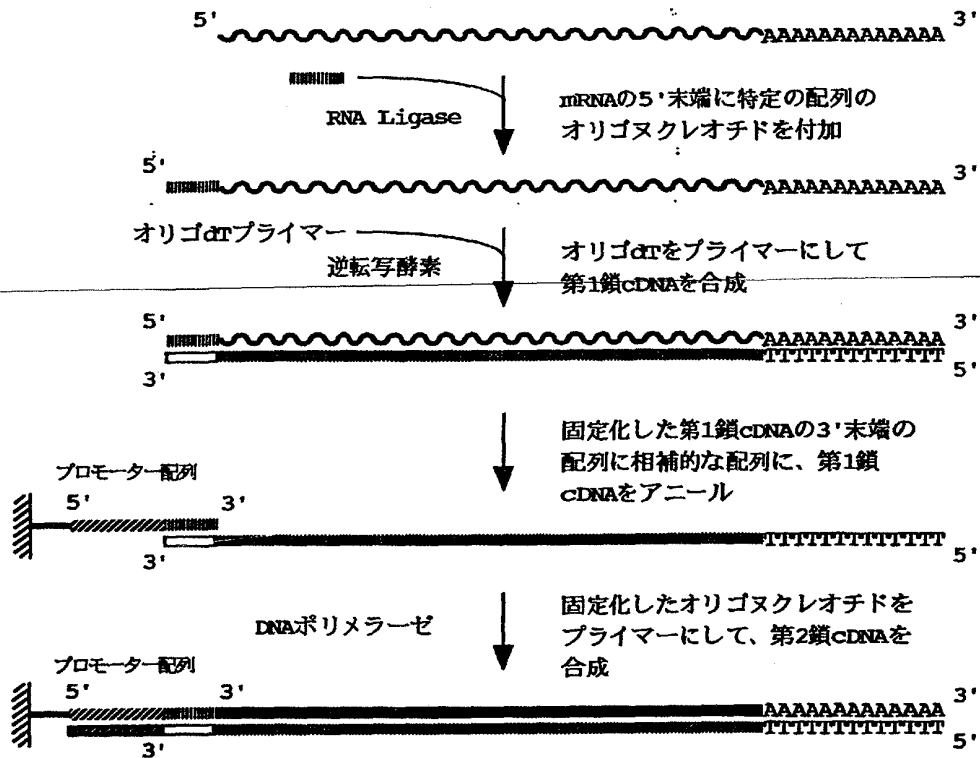
【図4】



【図5】



【図6】



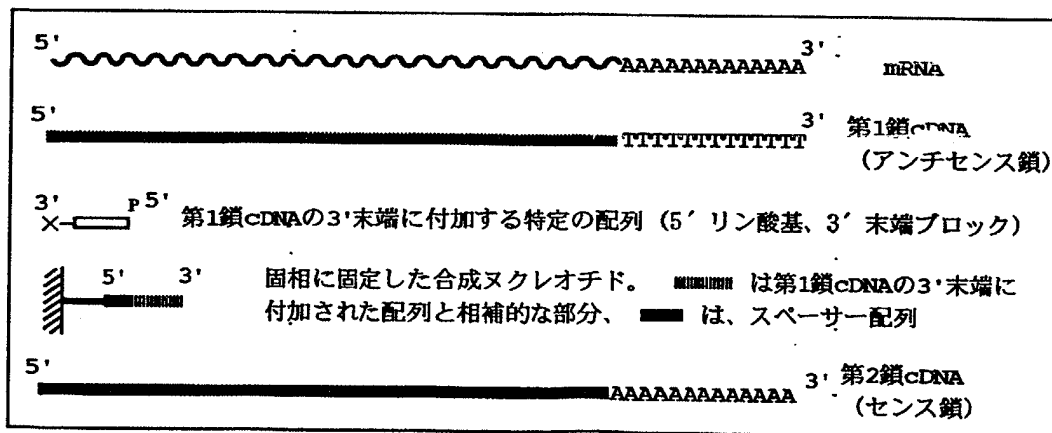
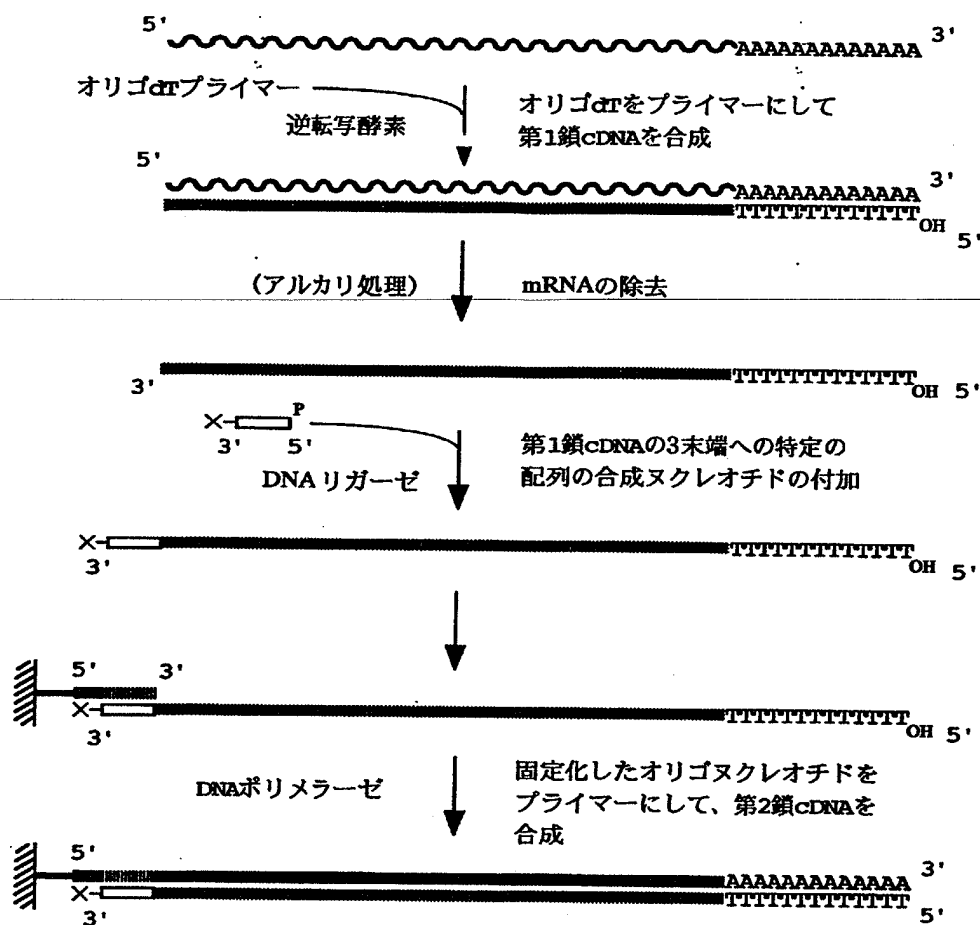
【書類名】要約書

【要約】

【課題】 センス鎖cDNA（第2鎖）の5'側で固定されたcDNAを提供すること。

【解決手段】 アンチセンス鎖（第1鎖）の3'側に人為的な既知の塩基配列を付加し、この塩基配列に相補的なプライマーを利用して第2鎖の5'側を固定する。完全長cDNAを高い確率で含む良質なcDNAライブラリを得ることができる。

【選択図】



特平10-262941

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 597059742

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那1532番地3

【氏名又は名称】 株式会社ヘリックス研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

特平10-26294

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597059742]

1. 変更年月日	1997年 4月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	千葉県木更津市矢那1532番地3
氏 名	株式会社ヘリックス研究所